



SPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Etsuko MATSUNAGA, et al.

GAU: 1638

SERIAL NO: 10/626,609

EXAMINER:

FILED: July 25, 2003

FOR: METHOD FOR EFFICIENTLY PRODUCING TRANSGENIC PLANT USING AUXIN PRECURSOR

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number _____, filed _____, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. _____ Date Filed _____
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2002-218978	July 26, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. _____ filed _____
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number _____
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. _____ filed _____; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s) _____
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Roland E. Martin
Registration No. 48,082

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

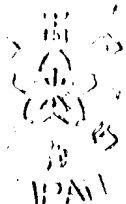
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 1 8 9 7 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 1 8 9 7 8]

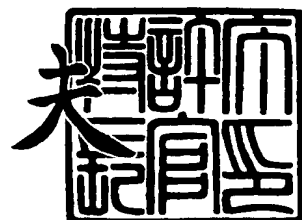
出 願 人 日 本 製 紙 株 式 会 社
Applicant(s):



2 0 0 3 年 8 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PA-69BIOJ0

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

 【氏名】 松永 悦子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

 【氏名】 杉田 耕一

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

 【氏名】 海老沼 宏安

【特許出願人】

 【識別番号】 000183484

 【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

 【代表者】 三好 孝彦

【代理人】

 【識別番号】 100074572

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 河澄 和夫

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 012553

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704982

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オーキシン前駆体を利用した遺伝子組換え植物の効率的作成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 遺伝子組換え植物を作成する方法であって、次の過程 (A)、(B)、(C) からなることを特徴とする方法。

(A) 目的遺伝子、及び、選抜マーカー遺伝子としてオーキシン前駆体からオーキシンを合成する酵素の遺伝子を含む、植物への遺伝子導入用ベクターを植物細胞に導入する過程

(B) このベクターにより遺伝子導入された植物細胞を、上記オーキシン前駆体及び／又はその類縁物質の存在下で培養して再分化組織を生成させ、この再分化組織を検出して選抜する過程

(C) 前記 (B) で選抜した再分化組織を培養して植物個体を再生する過程

【請求項 2】 オーキシン前駆体及び／又はその類縁物質として、インドールアセトアミド及び／又はナフタレン酢酸アミド、オーキシン前駆体からオーキシンを合成する遺伝子として、i a a H (indoleacetamide hydrolase) 遺伝子である遺伝子導入用ベクターを用いて行う、請求項 1 に記載の遺伝子組換え植物の作成方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の遺伝子導入用ベクターの選抜マーカー遺伝子として、オーキシン前駆体からオーキシンを合成する遺伝子と共に、サイトカイニン合成遺伝子を更に含むものを用いて行う、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子組換え植物の作成方法。

【請求項 4】 サイトカイニン合成遺伝子が i p t (isopentenyltransferase) 遺伝子である、請求項 3 に記載の遺伝子組換え植物の作成方法。

【請求項 5】 目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子として i a a H (indoleacetamide hydrolase) 遺伝子及び i p t (isopentenyltransferase) 遺伝子を含み、かつ、i a a M (tryptophan monooxygenase) 遺伝子を含まない、植物への遺伝子導入用ベクター。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本願発明は、遺伝子工学的手法を用いて効率的に遺伝子組換え植物を作成する方法、及び、その方法に用いるベクターに関する。

【0002】**【従来の技術】**

目的遺伝子を対象植物に導入し、遺伝子組換え植物を作成するには、（１）目的遺伝子の植物細胞への導入、（２）目的遺伝子が導入された細胞のみからなる植物組織（目的遺伝子導入組織）の選抜、（３）選抜された植物組織からの植物体の再生、の３段階を必ず経ることになる。このうち目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては、一般に、細胞培養の段階で、目的遺伝子の発現のみを指標としてかかる組織を選抜することは容易ではないため、目的遺伝子は、その発現が容易に検出できる選抜マーカー遺伝子と共に植物細胞に導入され、目的遺伝子導入組織は、この選抜マーカー遺伝子の発現の有無によって選抜される。このような選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性を付与するカナマイシン抵抗性遺伝子（**NPTII**：ネオマイシンリン酸化酵素遺伝子）やハイグロマイシン抵抗性遺伝子（**HP T**：ハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子）、農薬耐性を付与するスルフォニルウレア系抵抗性遺伝子（**ALS**：アセトラクテート合成酵素遺伝子）等、薬剤耐性に関与する遺伝子が実用的に多く用いられている。

【0003】

薬剤耐性に関与する遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いた場合には、これらの薬剤を含む培地で、遺伝子導入処理後の細胞を培養して選抜マーカー遺伝子の発現の有無、つまりはかかる薬剤に対する耐性を評価し、これを指標として選抜を行うこととなる。これらの薬剤は、もともと植物細胞に対し毒性を有しているため、選抜マーカー遺伝子（ひいては目的遺伝子）が導入されていない植物細胞は、かかる培地で培養を行うことにより枯死するからである。しかし、この場合において耐性がある、即ちかかる薬剤の存在下で植物細胞が増殖するといっても、これは程度の問題であり、このような薬剤の存在下での培養が、植物細胞に

とって好ましからぬ影響を与えることは避け難く、現実には、植物細胞の活性低下に伴う目的遺伝子導入組織の増殖率や再分化率の低下等が問題となっている。

【0 0 0 4】

かかる問題を解決すべく、本願出願人は、先に特開平 9 - 1 5 4 5 8 0 において、新規な植物への遺伝子導入用ベクター、及び、このベクターを用いて行う植物への遺伝子導入方法を提案した。このベクター及び方法を用いて植物への遺伝子導入を行えば、植物細胞の活性を低下させる薬剤を用いずに、遺伝子導入処理後の植物組織の形態変化のみを指標として、目的遺伝子導入組織を選抜することが可能となる。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

上記した特開平 9 - 1 5 4 5 8 0 に開示のベクター及び方法では、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモン合成遺伝子等の形態異常誘導遺伝子を用いており、目的遺伝子導入組織は、遺伝子導入処理を行った組織から再分化する不定芽や不定根として得ることができる。しかし、こうして得られる不定芽や不定根の中には、目的遺伝子が導入されていないもの（以下、エスケープとも呼ぶ。）もかなり多く存在していた。これは、目的遺伝子と共に形態異常誘導遺伝子を導入した細胞中で産生される植物ホルモン等が、その周囲の細胞にも移行して影響を与え、その影響を受けた非遺伝子導入細胞からも形態異常を示す組織が分化・増殖してくるためであると考えられる。一般に遺伝子導入が難しいとされる植物においては、そもそも不定芽等の再分化率が悪い上に、このエスケープの存在のため目的遺伝子導入組織の選抜効率が非常に悪く、その向上が特に望まれていた。

【0 0 0 6】

本願発明は、かかる問題を解決すべくなされたものであり、植物細胞の活性を低下させる薬剤を用いずに目的遺伝子導入組織を選抜することができ、しかも、その選抜効率が改善された、遺伝子組換え植物の効率的作成方法と、この方法に用いるベクターを提供することを目的とする。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは鋭意研究の結果、目的遺伝子が導入された細胞内で合成されるオーキシン量を人為的に調節することにより、上記目的が達成されることを見出し、本願発明を完成した。

【0008】

すなわち、本願発明は、遺伝子組換え植物を作成する方法であって、次の過程(A)、(B)、(C)をからなる方法を提供する。

【0009】

(A) 目的遺伝子、及び、選抜マーカー遺伝子としてオーキシン前駆体からオーキシンを合成する酵素の遺伝子（以下、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子という。）を含む、植物への遺伝子導入用ベクターを植物細胞に導入する過程

(B) このベクターにより遺伝子導入された植物細胞を、上記オーキシン前駆体及び／又はその類縁物質の存在下で培養して再分化組織を生成させ、この再分化組織を検出して選抜する過程

(C) 前記(B)で選抜した再分化組織を培養して植物個体を再生する過程

【0010】

また、本願発明は、目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子として i a a H (indole acetamide hydrolase) 遺伝子及び i p t (isopentenyltransferase) 遺伝子を含み、かつ、i a a M (tryptophan monooxygenase) 遺伝子を含まない、植物への遺伝子導入用ベクターをも提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本願請求項1～4に記載の方法（以下、本願発明の方法という。）は、選抜マーカー遺伝子として、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子を用いる。オーキシンとは植物ホルモンの1種であり、細胞の伸長生長と分裂を促進することが知られている。例えば、植物病原菌であるアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens、以下、単にA.ツメファシエンスという。)では、トリプトファンが酵素トリプトファンモノオキシゲナーゼ (tryptophan mon

ooxygenase) により酸化されて、オーキシン前駆体であるインドールアセトアミド (IAM) となり、次いで、この IAM が酵素インドールアセトアミドヒドロラーゼ (indoleacetamide hydrolase) により加水分解されて、天然オーキシンであるインドール酢酸 (IAA) となる。このとき、トリプトファンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子は i a a M 遺伝子、インドールアセトアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子は i a a H 遺伝子である (D. Inze、M. Van Montagu、Mol. Gen. Genet、194:265、1984)。 i a a H 遺伝子が単独で存在していても、オーキシンが合成されることはない (Harry Klee、Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.、1991、42:529-51)。オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子として、この i a a H 遺伝子は解析も相当に進んでおり、当業者が容易に取得可能であることから、本願発明に用いる遺伝子として好ましい。

【0012】

なお、選抜マーカー遺伝子としては、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子と共に、他の植物ホルモン合成遺伝子、例えば、上記 i a a M 遺伝子や、側芽の生長と細胞の分裂を促進する植物ホルモンである、サイトカイニンの合成遺伝子を用いることができる。特にサイトカイニン合成遺伝子を用いた場合には、本願発明の方法により目的遺伝子を導入した植物細胞からの再分化組織の生成が、これを培養する培地中のオーキシン前駆体及び／又はその類縁物質の濃度を調節するのみでコントロールすることができるようになる。サイトカイニン合成遺伝子として最も代表的な遺伝子は i p t 遺伝子 (A. C. Smigocki、L. d. Owens、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5131、1988) である。この遺伝子も解析が相当に進み、当業者は容易にこれを取得することができるので、本願発明に用いる遺伝子として好ましい。

【0013】

本願発明の方法は、これらの植物ホルモン遺伝子からなる選抜マーカー遺伝子を、目的遺伝子と共に、植物への遺伝子導入用ベクターとして公知のものに組込んで、植物細胞に導入する。植物細胞へのベクターの導入は、植物に感染するウイルスや細菌を介して間接的に、あるいは、物理的・化学的手法によって直接的に行うことができる (I. Potrykus、Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Bi

ol., 42:205, 1991)。

【0014】

植物に感染するウイルスや細菌を介してベクターの導入を行う場合は、例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルス、タバコモザイクウイルス、ブロムモザイクウイルス等のウイルスや、A. ツメファシエンス、アグロバクテリウム・リゾジェネス等の細菌が使用できる。また、物理的・化学的手法によってベクターの導入を行う手法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、融合法、高速バリスティックペネトレーション法等を挙げることができる。

【0015】

遺伝子導入処理を行った植物細胞は、オーキシン前駆体及び／又はその類縁物質の存在下で培養して不定芽等の再分化組織を生成させる。ここでオーキシン前駆体又はその類縁物質とは、選抜マーカー遺伝子として導入した、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子が発現することで、オーキシン又はオーキシンと同様な生理活性を持つ物質（以下、まとめてオーキシン様物質ともいう。）に変換される物質である。例えば、上記 i a a H 遺伝子が発現するとインドールアセトアミドヒドロラーゼが合成されるが、この酵素は、その本来の基質である IAM の他に、ナフタレン酢酸アミド (NAM) も IAM と同様に加水分解し、合成オーキシンであるナフタレン酢酸 (NAA) に変換する。従って、本願発明において、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子として i a a H 遺伝子を用いた場合には、オーキシン前駆体の類縁物質としてこの NAM も、オーキシン前駆体である IAM と同様に用いることができる。

【0016】

なお、不定芽等の再分化組織の生成は、主として、サイトカイニンとオーキシンによってコントロールされることが知られている。即ち、サイトカイニン／オーキシン比が高い場合には芽の分化が誘導され、サイトカイニン／オーキシン比が低い場合には根の分化が誘導される (John D. HaMill, Aust. J. Plant Physiology, 20:405, 1993)。

【0017】

一方、本願発明において目的遺伝子が導入された細胞には、選抜マーカー遺伝子としてオーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子も導入されている。従って、オーキシシン前駆体及び／又はその類縁物質とサイトカイニンとをそれぞれ適当量添加した培地で遺伝子導入処理後の植物細胞を培養することにより、目的遺伝子が導入された不定芽等の再分化組織を生成させることができる。オーキシシン前駆体等は、オーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子の働きにより、その添加量に応じ、目的遺伝子が導入された植物細胞内でオーキシシン様物質に変換されるため、これらオーキシシン前駆体等とサイトカイニンとをそれぞれ適当量添加した培地で培養すれば、目的遺伝子が導入された細胞においては、結局、オーキシシンとサイトカイニンが適当量供給され、不定芽等の再分化に適正なサイトカイニン／オーキシシン比となるからである。一方、目的遺伝子が導入されていない細胞は、このとき、目的遺伝子が導入された細胞とは異なった挙動をとる。この細胞は、オーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子が導入されていないため、オーキシシン前駆体等をオーキシシンとして利用する能力が極めて低く、培地中に添加されたオーキシシン前駆体等とサイトカイニンのうち、主にサイトカイニンしか利用できないからである。

【0018】

さらに、本願発明の選抜マーカー遺伝子として、オーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子と共にサイトカイニン合成遺伝子を用いた場合には、前記したように、遺伝子導入処理後の植物細胞を、オーキシシン前駆体及び／又はその類縁物質の濃度を適当に設定した培地で培養するだけで、目的遺伝子が導入された不定芽等を再分化させることができる。このとき目的遺伝子が導入された細胞内では、オーキシシン前駆体等はその添加量に応じてオーキシシン様物質に変換され、また、サイトカイニン合成遺伝子により、サイトカイニンを培地に添加しなくともサイトカイニンが活発に合成されるので、オーキシシン前駆体等を適当量添加した培地で培養すれば、目的遺伝子が導入された細胞において、サイトカイニン／オーキシシン比は不定芽等の再分化に適正なものとなるからである。一方、目的遺伝子が導入されていない細胞は目的遺伝子が導入された細胞とはかなり異なった挙動をとる。かかる細胞では、オーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子もサイトカイ

ニン合成遺伝子も導入されていないため、こうした植物ホルモンが殆ど生産されないからである。

【0019】

以上より明らかなように、本願発明の方法によれば、再分化組織の生成にあたり、培地中に添加するオーキシン前駆体及び／又はその類縁物質やサイトカイニンの量をコントロールすることで、目的遺伝子が導入された不定芽等を優先的に再分化させ、エスケープの確率を減少させることができる。これは特に、選抜マーカー遺伝子として、オーキシン前駆体-オーキシン合成遺伝子と共にサイトカイニン合成遺伝子を用いた場合に、より大きな効果が得られる。

【0020】

実際に培地中に添加すべきオーキシン前駆体等やサイトカイニンの具体的な量は、これら植物ホルモンの種類と、本願発明の方法により遺伝子組換え体を作成しようとする植物の種類に応じて、適宜決定することができる。この量を決定するには、例えば、本願発明において使用する選抜マーカー遺伝子と、GUS (β -D-glucuronidase) 遺伝子等のレポーター遺伝子とを含むベクターを用いて、遺伝子組換え体を作成しようとする植物に遺伝子導入処理を行う。遺伝子導入処理後の組織は、培地中のオーキシン前駆体等やサイトカイニンの種類と量を何段階かに変化させて培養し、不定芽等を再分化させてレポーター遺伝子の発現を調査する。この場合においてレポーター遺伝子を発現している不定芽等の再分化率が最も高くなるような条件が、目的遺伝子が導入された植物細胞の再分化組織生成に最も適した条件であるので、本願発明の方法により、目的遺伝子とその植物に導入して遺伝子組換え体を作成する際には、オーキシン前駆体等やサイトカイニンの種類と量に関してこの条件を採用すればよい。

【0021】

なお、上記再分化組織生成のための培地には、オーキシン前駆体等やサイトカイニン以外の、植物細胞の増殖と分化に必要な他の成分及び／又は植物細胞の増殖と分化には必要がない他の成分を、本願発明の目的を損ねない範囲で添加することができる。このような培地としては、例えば、MS (Murashige and Skoog Physiol. Plant, 15:473-497, 1962)、WPM (Loyd and McCown Prop. Int. P

lant Prop. Soc., 30:421-427, 1980) 等によく知られた基本培地そのものに、又は遺伝子組換え体を作成しようとする植物に適するようこれらの基本培地に若干の改変を加えたものに、オーキシシン前駆体等やサイトカイニンを添加し、炭素源として 1～3 w/v% のシュクロース、固形剤として 0.5～1.0 w/v% の寒天又は 0.1～0.4 w/v% のジェランガムを添加した固形培地を用いることができる。

【0022】

本願発明の方法は、以上のようにして得られた不定芽等の再分化組織を検出して選抜し、植物個体を再生することにより、目的遺伝子が導入された遺伝子組換え植物を作成する。ここで選抜される組織は、不定芽等の再分化組織であることから、特殊な試薬や器具を用いることなく肉眼で検出し、選抜することができる。さらに、選抜マーカー遺伝子として導入したオーキシシン前駆体ーオーキシシン合成遺伝子と、再分化組織生成に用いる培地中に添加したオーキシシン前駆体及び／又はその類縁物質との協働作用によって、このようにして選抜された再分化組織に目的遺伝子が導入されている確率は、従来と比べ高くなっている。従って、目的遺伝子導入組織の選抜効率が良く、こうして得られた再分化組織を定法に従って植物個体に再生することで、目的遺伝子が導入された遺伝子組換え植物を効率的に作成することができる。

【0023】

例えば、植物個体への再生は、得られた再分化組織が不定芽である場合には、この不定芽をそのまま、又はある程度増殖させてから切出し、発根培地に挿し付けて発根させることにより行うことができる。このとき、培養温度は 15～30℃、光強度は $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 未満が好ましい。発根培地としては、上記の基本培地又はこれを希釈したものに、植物ホルモンとして NAA やインドール酪酸等のオーキシシン類 1 種類以上を組合せ、更に炭素源としてシュクロース 5～30 g/l を添加した液体培地又は寒天等にて固化させた固体培地を用いることができる。

【0024】

また、本願請求項 5 に記載のベクター（以下、本願発明のベクターという。）

は植物への遺伝子導入用ベクターであって、植物染色体への遺伝子導入部位に、目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子として i a a H 遺伝子及び i p t 遺伝子を含み、かつ、i a a M 遺伝子を含まないことを特徴とする。本願発明の方法は、かかる構成のベクターを用いて行うことにより、その目的をより高いレベルで達成することが可能となる。

【0025】

本願発明の方法に用いるベクター及び上記本願発明のベクターには、本願発明の目的を損ねない範囲で、ここまでに述べた遺伝子以外の他の遺伝子や因子（特定の機能を有する DNA 配列）を含んでいても構わない。例えば、特開平 9-154580 にて本願出願人が提案しているように、オーキシン前駆体—オーキシン合成遺伝子やサイトカイニン合成遺伝子を脱離能を有する DNA 因子と組み合わせ用いれば、再分化組織の選抜後、選抜マーカー遺伝子として用いたこれらの遺伝子を除去することができるので、選抜マーカー遺伝子の影響が全く排除された遺伝子組換え植物を得ることが可能となる。かかる脱離能を有する DNA 因子は、トランスポゾンや部位特異的組換え系等より得ることができる。

【0026】

本願発明の方法及びベクターを適用することができる植物の種類に特に制限はない。しかし、木本植物等、遺伝子組換え体の作成が困難であるとされている植物に適用することにより、本願発明の方法及びベクターは特に大きな効果を発揮することができる。

【0027】

また、本発明の方法及びベクターにより植物に導入する目的遺伝子も種類を問わない。農業的に優れた形質を付与できる遺伝子、農業的に優れた形質を付与するとは限らないが、遺伝子発現機構の研究に必要とされる遺伝子等、その目的に応じて種々選択することができる。

【0028】

【作用】

植物の組織培養において、培養組織から植物個体を再生するまでの過程には、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンがその各段階において深く関わ

っている。これは、不定芽等の再分化組織の生成についても例外ではない。前記したように、不定芽等の生成はサイトカイニン／オーキシン比によってコントロールされ、細胞内のサイトカイニン／オーキシン比が適正な値となって始めて、その細胞は不定芽等を生成する。

【0029】

従って、選抜マーカー遺伝子を単にサイトカイニン合成遺伝子及び／又はオーキシン合成遺伝子として、植物細胞に目的遺伝子を導入しても、目的遺伝子が導入された再分化組織が得られる確率は低い。この場合は目的遺伝子が導入された細胞において、これら選抜マーカー遺伝子の働きによってサイトカイニンとオーキシンが活発に生産されることとなるが、その生産量は人為的にコントロールすることができないので、これらの植物ホルモン遺伝子が導入された細胞、つまりは目的遺伝子が導入された細胞中のサイトカイニン／オーキシン比は必ずしも適正な値にならない。そのため、これらの細胞が、目的遺伝子が導入されていない細胞に対して優先的に再分化するとは限らないからである。

【0030】

そこで、本願発明においては、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用い、これとオーキシン前駆体等との協働作用により、目的遺伝子が導入された細胞内で合成されるオーキシン量を人為的に調節する。即ち、目的遺伝子と共に、選抜マーカー遺伝子としてオーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子を用いて植物組織に遺伝子導入処理を行い、この植物組織をオーキシン前駆体及び／又はその類縁物質を添加した培地で培養する。すると、目的遺伝子が導入された細胞においては、培地中のオーキシン前駆体等の濃度に応じてオーキシンが生産されるので、培地へのオーキシン前駆体等の添加量を調節することで、細胞内のオーキシン量も調節できることとなる。このとき、もう一方の植物ホルモンであるサイトカイニンは、オーキシン前駆体等と共に培地中に添加するか、オーキシン前駆体ーオーキシン合成遺伝子と共にサイトカイニン合成遺伝子を細胞中に導入することで、目的遺伝子が導入された細胞内に一定量が供給されるようにすれば、結局、細胞内のサイトカイニン／オーキシン比も調節されることとなる。

【0031】

本願発明は、このようにして、目的遺伝子導入細胞中のサイトカイニン／オーキシン比が不定芽等の再分化に最適となるよう調節することにより、この細胞からの再分化組織の生成を促進して、遺伝子導入処理後の植物組織から、目的遺伝子が導入された不定芽等を優先的に再分化させ、エスケープの確率を減少させる。この効果は特に、選抜マーカー遺伝子としてオーキシン前駆体－オーキシン合成遺伝子と共にサイトカイニン合成遺伝子を用いた場合に大きいと考えられる。この場合においては、選抜マーカー遺伝子としてオーキシン前駆体－オーキシン合成遺伝子のみを使用した場合と比べ、目的遺伝子が導入された細胞とこれが導入されていない細胞との間で、植物ホルモンに関する細胞内の生理的環境の差が大きい。このため、適当量のオーキシン前駆体等を培地に添加して培養した場合、目的遺伝子導入細胞がより優越的な不定芽分可能を示すと推測されるからである。

【0032】

【実施例】

以下に、本願発明を実施例に基づいて説明する。

【0033】

[実施例1]

目的遺伝子のモデルとしてGUS遺伝子、選抜マーカー遺伝子として*i p t*遺伝子と*i a a H*遺伝子を有するプラスミドp I A H 6をベクターとして、本願発明の方法により、ユーカリ・グロビュラス (*Eucalyptus globulus*、以下、E. グロビュラスという。) への遺伝子導入を行い、遺伝子組換え体を作成した。

【0034】

p I A H 6の構造のうち、植物染色体に組込まれることとなる領域 (T-DNA領域) を図1に示す。図中、丸で囲んだP、Tは、それぞれ*i p t*遺伝子及び*i a a H*遺伝子自身のプロモーター及びポリアデニル化シグナルを示し、N O S－Pはノパリンシンセターゼ遺伝子のプロモーター、Tはノパリンシンセターゼ遺伝子のポリアデニル化シグナル、35 S－Pはカリフラワーモザイクウィルスの35 Sプロモーターを示す。また、図の両端の黒い鋸型は、T-DNA領域

を画するRBサイトとLBサイトを表している。このプラスミドのT-DNA領域以外の部分は、市販の植物への遺伝子導入用ベクターpBI121（東洋紡績（株）製）の対応する部分と同様の構造をしている。

【0035】

なお、このプラスミドpIAH6は、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109 株に導入し、この大腸菌をE. coli JM109 (pIAH6) として国内寄託に付している（受託番号FERM P-16882）。

【0036】

I. アグロバクテリウムへのプラスミドpIAH6の導入

A. ツメファシエンスEHA105株を、10mlのYEB液体培地（ビーフエキス5g/l、酵母エキス1g/l、ペプトン1g/l、シュクロース5g/l、2mM MgSO₄、22℃でのpH7.2（以下、特に示さない場合、22℃でのpHとする。））に接種し、OD₆₃₀が0.4から0.6の範囲に至るまで、28℃で培養した。この培養液を、6900×g、4℃、10分間遠心して集菌した後、菌体を20mlの10mM HEPES（pH8.0）に懸濁して、再度6900×g、4℃、10分間遠心して集菌し、次いでこの菌体を200μlのYEB液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。

【0037】

アグロバクテリウム菌体へのプラスミドpIAH6の導入は、このようにして調整されたプラスミド導入用菌液50μlと上記pIAH6 3μlを0.5mlチューブ（アシスト社製）内で混合し、これをエレクトロポレーション法（ジーンパルサーIIシステム（BIORAD社製））に供することにより行った。エレクトロポレーション後は、この混合液に200μlのYEB液体培地を加えて25℃で1時間振とうして培養し、得られた菌体を50mg/lカナマイシン添加YEB寒天培地（寒天1.5w/v%、他の組成は上記に同じ。）に播種して28℃で2日間培養を続け、A. ツメファシエンスの菌コロニーを形成させた。このコロニーの菌体からアルカリ法でプラスミドを抽出し、制限酵素HindIII、SmaI、及びEcoRIにより切断してアガロースゲル電気泳動にて分析することにより、A. ツメファシエンスEHA105株へのpIAH6の導入を確

認した。

【0038】

II. ユーカリへの pIAH6 の導入

チリ産 E. グロビュラスの種子を、70%エタノールに約1分間浸漬し、さらに、2%次亜塩素酸ソーダ水溶液に約4時間攪拌しつつ浸漬して殺菌した後、無菌水でよく洗浄して、ゼアチン 0.5 mg/l を添加した MS 寒天培地に播種し、発芽促進のため 4℃の冷蔵庫で2日間保存してから、25℃、光強度約 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の全明条件下で培養し、これを発芽させた。発芽用培地に種子を播種してから1~2週間後、発芽苗の頂芽、子葉及び根を切取って胚軸を採取し、更にこの胚軸を約5mmに切断して遺伝子導入用試料とし、以下の実験に供した。

【0039】

上記 I でプラスミド pIAH6 を導入した A. ツメファシエンス EHA105 株を YEB 液体培地で一夜培養後、EG 基本培地で $\text{OD}_{630} = 0.5$ に希釈し、この菌液に上記のようにして調整した胚軸の切片を浸漬した。次いでこの切片を、余分な菌液を除去した上で、EG 基本培地にゼアチン 1.0 mg/l、NAA 0.05 mg/l、アセトシリゴン 40 mg/l を添加した寒天培地（寒天 8.5 g/l）で3日間、25℃、暗所にてアグロバクテリウム菌と共存培養することにより、これに pIAH6 導入アグロバクテリウムを感染させた。なお、EG 基本培地としては、アンモニア態窒素と硝酸態窒素の濃度比を 1:3 とした改変 MS 培地（ NH_4 5 mM、 NO_3 15 mM）にシュクロース 20 g/l を添加して用いた。

【0040】

感染培養後の切片は、ティカルシリン 500 mg/l、及び、オーキシン前駆体の類縁物質である NAM $1 \mu\text{M}$ 又は $10 \mu\text{M}$ を添加した EG 基本寒天培地（寒天 8.5 g/l）に置床して、25℃、光強度 $30 \sim 40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の全明条件下で、2週間ごとに植え継ぎながら同培地で培養を続けた。置床した切片のうち、早いものはアグロバクテリウムの感染後2ヶ月頃から不定芽を再分化させた。

【 0 0 4 1 】

アグロバクテリウムの感染から 3 ヶ月後、目的遺伝子のモデルとして用いた G U S 遺伝子の発現を見るために、再分化してきた不定芽について、Jeffersonらの方法に準拠し、G U S 染色試験を行い、染色される不定芽の数（目的遺伝子が発現している不定芽の数）を調べることで、目的遺伝子が導入された不定芽がどの程度得られているかを判定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 4 2 】

【表 1】

表 1. E. グロビュラスの遺伝子組換え体作成に *i a a H* 遺伝子と NAM 添加が与える効果

NAM 濃度 [μM]	A	B	B/A	C	C/B	C/A
	供試試料 [切片数]	不定芽分化 ^{*1} [切片数]	再分化率 [%]	GUS+ 不定芽分化 ^{*2} [切片数]	選抜効率 [%]	遺伝子導入率 [%]
1	60	21	35.0	8	38.1	13.3
10	48	2	4.2	1	50.0	2.1

* 1 不定芽を分化させた切片数

* 2 GUS 染色された不定芽を分化させた切片数

【 0 0 4 3 】

表1から明らかなように、不定芽の再分化率、選抜効率（再分化した不定芽に目的遺伝子が導入されている確率）、不定芽への遺伝子導入率（目的遺伝子が導入された不定芽が得られる率）を遺伝子導入用試料である切片基準で算出した場合、NAM濃度 $1\ \mu\text{M}$ の場合がそれぞれ 35.0%、38.1%、13.3%、NAM濃度 $10\ \mu\text{M}$ の場合がそれぞれ 4.2%、50.0%、2.1%であった。

【0044】

〔比較例1〕

ティカルシリン 500 mg/l 、及び、オーキシンであるNAAを $0\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 又は $10\ \mu\text{M}$ 添加したEG基本寒天培地（寒天 8.5 g/l ）にてアグロバクテリウム感染後の胚軸切片を培養した他は、実施例1と同様にしてE.グロビュラスへの遺伝子導入実験を行った。結果を表2に示す。

【0045】

【表 2】

表 2. E. グロピュラスの遺伝子組換え体作成に *i a a H* 遺伝子と *N A A* 添加が与える効果

NAA 濃度 [μM]	A	B	B/A	C	C/B	C/A
	供試試料 [切片数]	不定芽分化*1 [切片数]	再分化率 [%]	GUS+ 不定芽分化*2 [切片数]	選抜効率 [%]	遺伝子導入率 [%]
0	58	6	10.3	0	0	0
1	62	9	14.5	2	22.2	3.2
10	40	13	32.5	1	7.7	2.5

* 1 不定芽を分化させた切片数

* 2 GUS 染色された不定芽を分化させた切片数

【0046】

表2から明らかなように、この場合はいずれも選抜効率が低く、最も良い値を示したNAA 1 μ M添加の場合でも、切片基準で22.2%にしかならなかった。

【0047】

[比較例2]

選抜マーカー遺伝子として i p t 遺伝子しか有していないプラスミド p I P T 10 をベクターとして、実施例1又は比較例1と同様にE. グロビュラスへの遺伝子導入実験を行った。なお、このベクターも目的遺伝子のモデルとして、G U S 遺伝子を有している。

【0048】

このとき用いた p I P T 10 の T-DNA 領域の構造を図2に、遺伝子導入実験の結果を表3に示す。

【0049】

【表 3】

表 3. E. グロビュラスの遺伝子組換え体作成に *ipt* 遺伝子が与える効果

添加物濃度 [μ M]	A	B	B/A	C	C/B	C/A
	供試試料 [切片数]	不定芽分化*1 [切片数]	再分化率 [%]	GUS+ 不定芽分化*2 [切片数]	選抜効率 [%]	遺伝子導入率 [%]
—	46	3	6.5	0	0	0
NAM	46	2	4.4	0	0	0.0
	46	0	0	0	0	0.0
NAA	44	9	20.5	1	11.1	2.3
	44	7	15.9	0	0	0.0

*1 不定芽を分化させた切片数

*2 GUS 染色された不定芽を分化させた切片数

【0050】

表3から明らかなように、この場合も選抜効率が低く、最も良い値を示したNAA 1 μ M添加の場合でも、切片基準で11.1%にしかならなかった。

【0051】

[実施例2]

実施例1で使用したプラスミドpIAH6をベクターとして、本願発明の方法により、交雑ヤマナラシ（ポプルス・シーボルディ×ポプルス・グランディタータ：Populus Sieboldii×Populus grandidentata）への遺伝子導入を行い、遺伝子組換え体を作成した。

【0052】

交雑ヤマナラシY63株（秋田十條化成（株）内実験林より採取）の無菌苗の茎を、節を含まないように長さ5mmに切断し、これを更に縦に二つ割にしたものに、pIAH6を導入したA. ツメファシエンスLBA4404株（CLONTECH社より購入）を感染させることにより、この交雑ヤマナラシY63株にpIAH6を導入した。即ち、実施例1と同様にしてpIAH6を導入したA. ツメファシエンスLBA4404株をYEB液体培地で一夜培養後、Y基本培地でOD₆₃₀=0.5に希釈し、この菌液に上記のようにして調整した茎切片を浸漬した。次いでこの切片を、余分な菌液を除去した上で、Y基本培地にアセトシリゴン40mg/lを添加した寒天培地（寒天8g/l）で3日間、25℃、暗所にてアグロバクテリウム菌と共存培養することにより、これにpIAH6導入アグロバクテリウムを感染させた。なお、Y基本培地としては、改変MS培地（NH₄ 10mM、NO₃ 30mM）にシュクロース20g/lを添加して用いた。

【0053】

感染培養後の切片は、ティカルシリン500mg/l、及び、オーキシン前駆体の類縁物質であるNAM 1 μ M、5 μ M又は30 μ Mを添加したY基本寒天培地（寒天8g/l）に置床して、25℃、光強度30～40 μ mol/m²/sの全明条件下で培養を行った。2ヶ月後、再分化してきた不定芽を選抜して分離し、この不定芽について同条件で培養を続けて更に2ヶ月後（NAM存在下での

培養を開始してから4ヶ月後)、培養されている組織の形態を観察することで、選抜された不定芽に目的遺伝子が導入されているか否かを判定した。このとき、選抜された不定芽に目的遺伝子が導入されていれば、これと共に導入されている選抜マーカー遺伝子 (i p t 遺伝子) の働きにより、培養されている組織は多芽状を示すが、目的遺伝子が導入されていなければ、つまり選抜された不定芽がエスケープであれば培養組織が多芽状を示すことはない。エスケープには i p t 遺伝子が導入されておらず、これは単に、隣接して存在していた目的遺伝子導入細胞の影響を受けて不定芽を再分化したに過ぎないからである。

結果を表4に示す。

【0054】

【表 4】

表 4. 交雑ヤマナラシの遺伝子組換え体作成に *i a a H* 遺伝子と NAM 添加が与える効果

NAM 濃度 [μ M]	A	B	B/A	C	C/B	C/A
	供試試料 [切片数]	不定芽分化 ^{*1} [切片数]	再分化率 [%]	多芽体分化 ^{*2} [切片数]	選抜効率 [%]	遺伝子導入率 [%]
0	10	0	0	0	0	0
1	10	7	70.0	5	71.4	50.0
5	10	6	60.0	4	66.7	40.0
30	10	0	0	0	0	0

* 1 不定芽を分化させた切片数

* 2 4ヶ月培養後の観察で、多芽状と判定された不定芽を分化させた切片数

【0055】

表4から明らかなように、NAM濃度 $1\mu\text{M}$ 及び $5\mu\text{M}$ のとき、目的遺伝子が導入された不定芽が得られ、その選抜効率は切片基準で算出した場合、NAM濃度 $1\mu\text{M}$ の場合が50.0%、NAM濃度 $5\mu\text{M}$ の場合が40.0%であった。なお、表中には示していないが、このとき、NAM濃度 $1\mu\text{M}$ で再分化した不定芽の総数は67個であり、うち6個に目的遺伝子が導入されていた。また、NAM濃度 $5\mu\text{M}$ では総数34個の不定芽が再分化し、やはり5個に目的遺伝子が導入されていた。

【0056】

[比較例3]

ティカルシリン 500mg/l のみを添加したY基本寒天培地（寒天 8g/l ）にてアグロバクテリウム感染後の茎切片を培養した他は、実施例2と同様にし、交雑ヤマナラシへの遺伝子導入実験を行った。結果を表4に示す。

【0057】

表4より明らかなように、この場合には不定芽は再分化せず、目的遺伝子が導入された再分化個体も得られなかった。

【0058】

[実施例3]

チリ産E. グロビュラスの高発根性クローンの定芽を、実施例2のY基本培地にゼアチン 0.5mg/l を添加した培地を用いて無菌的に増殖させ、伸長してきた茎を 5mm に切断して遺伝子導入用試料とし、実施例1と同様にしてプラスミドpIAH6導入アグロバクテリウムを感染させた。

【0059】

感染培養後の切片は、ティカルシリン 500mg/l 、及び、オーキシン前駆体の類縁物質であるNAM $1\mu\text{M}$ を添加したEG基本寒天培地（寒天 8.5g/l ）に置床して、 25°C 、光強度 $30\sim 40\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ の全明条件下で、2週間ごとに植え継ぎながら同培地で培養を続けた。

【0060】

アグロバクテリウムの感染から4ヶ月後、Jeffersonらの方法に準拠してGU

S 染色試験を行い、再分化してきた不定芽について、目的遺伝子が導入された不定芽がどの程度得られているかを判定した。

【0061】

その結果、茎切片 40 片のうち、5 切片から不定芽が分化し、このうち 3 切片由来の芽に目的遺伝子が導入されていることが確認された。即ち、遺伝子導入用試料である切片基準で、不定芽再分化率、選抜効率、不定芽への遺伝子導入率はそれぞれ 12.5%、60.0%、7.5%であった。遺伝子が導入された不定芽が、遺伝子導入処理を行った試料に対して 7.5%の確率で得られたというこの事実は、E. グロビュラスのクローン苗を遺伝子導入材料とする場合において、驚くべきことである。

【0062】

[比較例 4]

プラスミド pIPT10 をベクターとして、実施例 3 と同様に E. グロビュラスの高発根性クローンへの遺伝子導入実験を行った。しかし、この場合には不定芽は再分化せず、目的遺伝子が導入された再分化個体も得られなかった。

【0063】

【発明の効果】

本願発明によれば、目的遺伝子が導入された植物細胞内のサイトカイニン／オーキシン比を人為的にコントロールすることができる。従って、目的遺伝子導入細胞のサイトカイニン／オーキシン比を、不定芽等の再分化組織の生成に最も適するように調節してこの細胞の再分化を促進させ、この細胞から不定芽等を優先的に再分化させることができる。

【0064】

これにより本願発明は、いわゆるエスケープの確率を減少させて目的遺伝子導入組織の選抜効率を向上させ、遺伝子組換え体の取得率を向上させる。これは特に、遺伝子組換え体の作成が困難であるとされている植物に適用した場合に効果が大きい。従って、本願発明によれば遺伝子組換え植物を効率的に作成することができる。

【0065】

また、本願発明において、選抜マーカー遺伝子を脱離能を有する DNA 因子と組み合わせて用いることにより、ここで用いた選抜マーカー遺伝子の影響が全く排除された遺伝子組換え植物も作成することが可能となる。

【0066】

すなわち、本願発明によれば、遺伝子組換え体の作成が困難な植物であっても効率的に遺伝子組換え体を作成することができ、しかも、選抜マーカー遺伝子の影響が全く排除され、目的遺伝子のみが導入された遺伝子組換え植物を作成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

pIAH6ベクターのうち、植物染色体に組込まれることとなる T-DNA 領域の構造を示す概念図である。

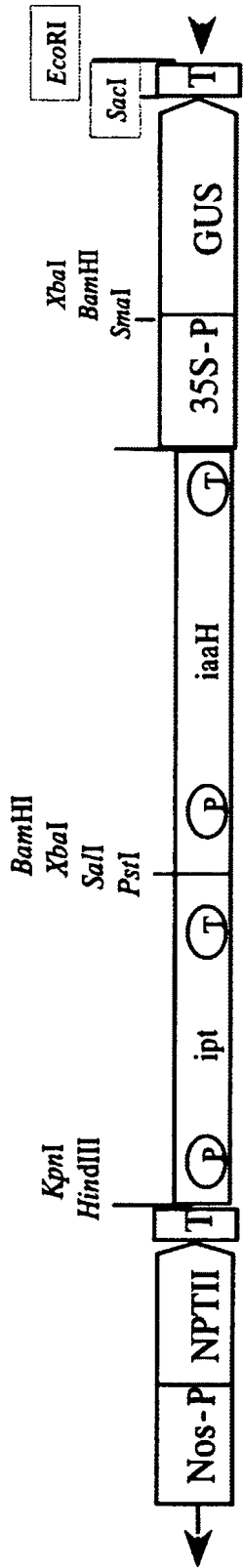
【図2】

pIPT10ベクターのうち、植物染色体に組込まれることとなる T-DNA 領域の構造を示す概念図である。

【書類名】

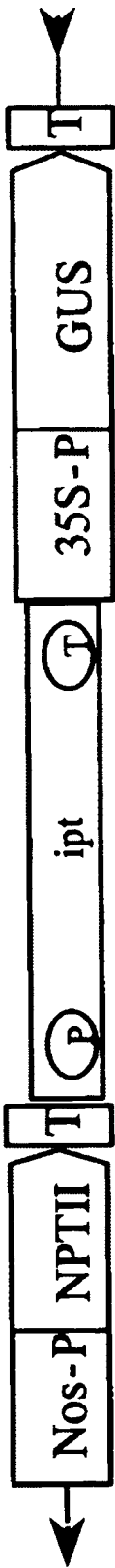
図面

【図 1】



pLAH6
16.1Kb

【図 2】



pIPT10

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物細胞の活性を低下させる薬剤を用いずに目的遺伝子導入組織を選抜することができ、しかも、その選抜効率が改善された、遺伝子組換え植物の効率的作成方法と、この方法に用いるベクターを提供する。

【解決手段】 目的遺伝子、及び、選抜マーカー遺伝子としてオーキシシン前駆体からオーキシシンを合成する酵素の遺伝子を含む、植物への遺伝子導入用ベクターを植物細胞に導入し、このベクターにより遺伝子導入された植物細胞を、上記オーキシシン前駆体及び／又はその類縁物質の存在下で培養して再分化組織を生成させ、この再分化組織を選抜して植物個体を再生する。例えば、オーキシシン前駆体からオーキシシンを合成する酵素の遺伝子として iaaH (indoleacetamide hydrolase) 遺伝子、オーキシシン前駆体等としてインドールアセトアミド又はナフタレン酢酸アミドを使用することができる。

【選択図】 表 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 1 8 9 7 8
受付番号	5 0 2 0 1 1 0 9 3 9 2
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 7 月 2 9 日

＜認定情報・付加情報＞

【提出日】 平成14年 7月26日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 1 8 9 7 8

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 1 8 3 4 8 4]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 4 月 7 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都北区王子 1 丁目 4 番 1 号

氏 名

日本製紙株式会社